AFFINITÄTSMARKIERUNG DER CODONBINDUNGSSTELLE VON ESCHERICHIA COLI RIBOSOMEN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Ernst Rössner

Bochum, 1981

AFFINITÄTSMARKIERUNG DER CODONBINDUNGSSTELLE VON ESCHERICHIA COLI RIBOSOMEN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Ernst Rössner

Bochum, 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung:

Donnerstag, 2. Juli 1981

Prüfungsvorsitzender : Prof.Dr.W.Kutzelnigg
1.Gutachter : Prof.Dr.O.Pongs
2.Gutachter : Priv.Doz.Dr.H.Duddeck

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Experimenteller Teil	2
2.1.	Allgemeine Arbeitsmethoden und Versuchsmaterial	2
2.2.	Synthesen	10
2.2.1.	Synthese von 4-Nitrophenyl-uridin-5'-phosphat	10
2.2.2.	Enzymatische Synthesen	12
2.2.3.	Reduktion von 5'-(4-Nitrophenylphospho) uridylyl-(3'-5')-guanylyl-(3'-5')-adenosin und Acylierung von 5'-(4-Aminophenylphospho)uridylyl-(3'-5')-guanylyl-(3'-5')-adenosin.	13
2.3.	Biochemische Analysenmethoden	14
2.3.1.	Bestimmung der biologischen Aktivität der Ribosomen (Initiationskomplexbildung)	14
2.3.2.	Inkubation von Escherichia Coli-Ribosomen mit *UGA;Affinitätsmarkierung der Ribosomen	15
2.3.3.	Auftrennung und Charakterisierung ribosomaler Proteine	16
3.	Ergebnisse	20
3.1.	Synthese und Charakterisierung von *UGA	20
3.2.	Reaktionen von *UGA mit Ribosomen aus Escherichia Coli	26
3.3.	Identifikation der mit *UGA markierten Proteine	27
3.3.1.	Gradientenanalyse der reagierten Ribosomen	30
3.3.2.	Elektrophoretische Analysen markierter ribosomaler Proteine	30
3.3.3.	Antikörperreaktion	38
4.	Diskussion	41
5.	Zusammenfassung	46
6.	Literaturverzeichnis	47

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549615_0072

1. Einleitung

Aufgabe dieser Arbeit war es, einen Beitrag zur Aufklärung von Struktur und Funktion von Ribosomen zu leisten.
Ribosomen sind die Zellbestandteile, an denen sich die Proteinsynthese nach der in der DNS gespeicherten Information, übermittelt durch die m-RNS, vollzieht. Die Proteinbiosynthese läuft ab unter Beteiligung der Ribosomen, der m-RNS, Aminoacyl-tRNS und mehrerer Faktoren sowie Nukleosidtriphosphaten. Sie stellt eine hochspezifische und komplexe Synthesereaktion dar, die mit einer Fehlerrate von 10^{-6} vor sich geht.

Die Problemstellung dieser Arbeit befaßt sich mit der Charakterisierung und Analyse der Codonbindungsstelle des Ribosoms mit Hilfe der Methode der Affinitätsmarkierung. Diese Methode wurde zum Erstenmal erfolgreich von Anfinsen(1) zur Aufklärung von Enzym-Substrat-Wechselwirkungen angewendet. Er konnte das aktive Zentrum der Nuklease aus Staphylococcus aureus mit chemisch reaktiven Substratanaloga markieren und entsprechend charakterisieren. Seither hat die Methode der Affinitätsmarkierung eine vielfache Verwendung gefunden, besonders auch auf dem Gebiet der Ribosomenforschung. Zu einem Überblick über Arbeiten auf diesem Gebiet sei auf die Literatur verwiesen(2).

In vorliegender Arbeit wurden Ribosomen mit einem chemisch modifizierten Codon, das als mRNS-Analogon diente, markiert. Als Codon wurde das Terminationstriplet UGA gewählt, insbesondere deshalb, weil Vergleichsdaten mit dem Initiationstriplet bereits vorlagen. Es sollte gezeigt werden, daß das Terminationscodon spezifisch an die Codonbindungsstelle des Ribosoms gebunden werden kann und die diesem Bindungszentrum angehörenden Proteine identifiziert werden. Weiter war es von Bedeutung, etwas über die Beschaffenheit des Bindungszentrums zu erfahren und darüber, ob das Ribosom von sich aus in der Lage ist Codone zu selektieren.

2 EXPERIMENTELLER TEIL

2.1. Allgemeine Arbeitsmethoden und Versuchsmaterial

Papierchromatographie

Mengen von ca.1 A_{260} wurden auf Whatman 3MM Papier aufgetragen, im gewünschten Laufmittelsystem entwickelt und die R_f-Werte bestimmt.

Laufmittel: A Isopropanpl/H_2O/25%NH_3 7:2:1
B n-Butanol/H_2O/Eisessig 5:3:2
C Äthanol/1M Ammoniumacetat (pH 7) unterschiedlicher Zusammensetzung

Laufzeit: A ca. 25 h
B und C ca. 20 h

Da Laufmittel B bei längerem Stehen Butylacetat bildet, mußte es vor Verwendung frisch angesetzt werden.

Präparative Papierchromatographie

Substanzmengen bis zu 100 mg wurden pro Bogen Whatman 3MM aufgetragen und im gewünschten Laufmittelsystem entwickelt. Da alle synthetisierten Substanzen im UV-Licht stark absorbieren, konnten die gewünschten Produkte unter UV-Licht angezeichnet, ausgeschnitten und mit Wasser eluiert werden.
Wurden Substanzen im Laufmittel C entwickelt, so mußten die Papierchromatogramme vor der Elution mit Äthanol behandelt werden, um anhaftendes Ammoniumacetat auszuwaschen.

Säulenchromatographie (Ionenaustausch-Chromatographie)
DEAE-und TEAE-Cellulose wurden nach Anweisung der Lieferfirma vorbehandelt, mit Laufpuffer äquilibriert, entgast und in die Säule gegossen. Die Auftragsmengen entsprachen ungefähr 1/10 der Säulenkapazität. Zuerst wurden ungeladene Verbindungen mit Wasser von der Säule gewaschen, die geladenen Produkte anschließend mit einem Salzgradienten (0,01-0,3M NH_4HCO_3 bzw. NH_4Ac) eluiert. Das Elutionsprofil wurde mit einer Durchflußküvette spektroskopisch verfolgt (Transmission UV Hg 254). Zur quantitativen Auswertung wurden die einzelnen Fraktionen

an einem Zeiss Spektralphotometer(PM QII) bei 260 nm vermessen.

UV- Spektrokopie

UV-Spektren zur Charakterisierung von Syntheseprodukten wurden mit einem Zeiss UV-Spektrometer(Typ M4 QIII) aufgenommen.Die Messungen wurden in Quarzküvetten (Schichtdicke 10 mm) bei pH1,pH 6 und pH 13 durchgefürt.

pH - Messungen

Eine Einstabmesskette mit zugehörigem Anzeigegerät (Typ Radiometer Kopenhagen)diente zur pH-Messung. Geeicht wurde die Elektrode mit Eichpuffer von pH 2,00; 7,00 und 9,00.

Lösungsmittel

Triäthylamin wurde nach Zusatz von Ninhydrin mehrere Stunden am Rückfluß gekocht und destilliert.Pyridin wurde über Calziumhydrid am Rückfluß gekocht und destilliert.Dioxan und Diäthyläther wurden durch Filtration über basische Aluminiumoxidsäulen getrocknet und peroxidfrei gemacht.Die Lösungsmittel wurden über Molekularsieb(4A) aufbewahrt.

Enzymatische Hydrolyse von Phosphorsäurediesterbindungen

Ca.1 A_{260} der Verbindung wurde in 0,1M Tris-Puffer(pH 8) gelöst,mit 10 µg Phosphodiesterase aus Crotalus terr. terr. und 10 µg Alkalischer Phosphatase aus E.Coli versetzt und 3-4 h bei 37°C inkubiert.Zur Spaltung mit Rnase A bzw.Rnase T_1 wurde dieselbe Menge der zu spaltenden Verbindung für 3 h in 0,1M Tris-Puffer(pH 8)bei 37°C inkubiert.

Analyse der enzymatischen Hydrolyseprodukte

Das Inkubationsgemisch wurde mit 0,5 ml 10% Sucroselösung versetzt und auf eine Nukleotidanalysatorsäule aufgetragen(Säule:0,6x60 cm;Technikon P-Harz).Die Säule wurde mit einem Druck von 8 atm.betrieben,der Fluß war 20ml/h.Unter diesen Bedingungen ergaben sich charakteristische Retensionszeiten für die Nukleoside.Zur quant.

Auswertung mußten die spektroskopisch vermessenen und aufgezeichneten Elutionen standartisiert werden.Die Integration ergab dann im Vergleich mit den integrierten Standardkurven definierte Nukleosidgehalte.

Quantitative Bestimmung des reaktiven Broms in der bromacetylierten Verbindung (3)

Die Umsetzung der bromacetylierten Verbindung mit Cystein ergab nach Hydrolyse des Reaktionsproduktes Carboxymethylcystein.Dieses konnte mit einem Aminosäureanalysator bestimmt werden.Man versetzte die bromacetylierte Verbindung mit einem zehnfachen Überschuß an Cystein in 0,2M $NaHCO_3$(Reaktionszeit 5h),hydrolisierte das Produkt in 6 M HCl bei 110°C 24 h,nahm die eingedampfte Lösung in Probenpuffer auf und bestimmte den Gehalt an Carboxymethylcystein mit dem Aminosäureanalysator. Das Säuleneluat wurde fraktioniert und die Radioaktivität bestimmt.

Alkalische Phosphatase(Orthophosphorsäuremonoesterphosphohydrolase E.C.3.1.3.1.)(4)

Anzucht der Bakterien(Escherichia Coli B/r/1 T_1^R)

Plattenmedium: 5g Yeast-Extrakt
10g Casamino acids
1g NaCl auf pH 7,4
+0,5ml 1M $MgSO_4$
+20g Agar
mit H_2O auf 1000 ml

Kulturmedium:A 130,50g Tris
41,85g NaCl
13,50g KCl
23,85g $(NH_4)_2SO_4$
45,00g Glycerin
45,00g Bacto-Pepton

Die Substanzen wurden in Wasser gelöst,mit HCl auf pH 7,4 gebracht und auf 9l aufgefüllt.Die Lösung wurde im Fermentertopf autoklaviert.

B 1,80g $MgCl_2x6\ H_2O$
0,14g $CaCl_2x2\ H_2O$

Die beiden Salze wurden in 100 ml Wasser gelöst und ebenfalls autoklaviert.

C 50 mg $ZnCl_2$
50 mg $FeCl3 \times 6 H_2O$

Die Salze wurden in 100 ml 0,1M HCl gelöst und kurz vor der Inbetriebnahme des Fermenters über ein Sterilfilter zugegeben.Von einer Platte wurde eine Kolonie abgenommen und eine Übernacht-Kultur zur Animpfung des Fermenters herangezogen.Die Bakterien wuchsen bis zu einer optischen Dichte von 1,18 bei 578 nm.Dies entsprach einer Konzentration von 3×10^8 Zellen/ml.
Der Fermenterinhalt wurde auf Eis gegossen und in einer Durchlaufzentrifuge(Cepa,Padberg) die Bakterien vom Medium abgetrennt.Um vorzeitige Lyse zu vermeiden, wurden die Bakterien mit 0,1 M Tris/HCl pH 7,7 gewaschen und abzentrifugiert.Die Enzymisolierung erfolgte wie beschrieben.
Enzymtest:
Alkalische Phosphatase setzt aus p-Nitrophenylphosphat durch Abspaltung von Phosphat Nitrophenol frei.Die Menge kann bei 410 nm im alkalischen Mflieu bestimmt werden. Als Maß für die Aktivität des Enzyms diente die nach einer Minute freigesetzte Menge Nitrophenol aus einer 6,6 mM Nitrophenylphosphatlösung in Tris-Puffer pH 8,2.

Polynukleotid Phosphorylase(Polyribonukleotid-orthophosphat-nukleotidyl-transferase E.C.2.7.7.8)(5)

15g Micrococcus luteus wurden in 300 ml Puffer(50 mM Tris, 5 mM $MgCl_2$,0,5 mM EDTA,1 mM Mercaptoäthanol,mit HCl auf pH 8)aufgeschlämmt,mit 5mg Lysozym und 10 mg Desoxyribonuclease I versetzt und eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur gerührt.Nach Zentrifugation(Sorvall RC2-B, GSA-Rotor,8000 Upm,15 min.)des Lysats wurde der Überstand in 25 ml Portionen in flüssigem Stickstoff eingefroren.Die Lösung wurde in diesen Portionen auf eine Sepharose 4B Säule(5x78cm)aufgetragen und die Säule mit Laufpuffer eluiert.Die enzymhaltigen Fraktionen wurden vereinigt.Das vereinigte Eluat wurde auf eine NaCl-Konzentration von 0,25 Mol/l gebracht und auf eine

DEAE-Sephadex A50 Säule(4,5 x 38 cm) aufgetragen.Die Säule wurde mit einem linearen Gradienten von 0,25-0,5 M NaCl eluiert.Die gesammelten Fraktionen wurden dem Enzymtest unterworfen.Es folgte Dialyse aller enzymhaltigen Fraktionen gegen 20%ige Polyäthylenglykollösung.Das Dialysat wurde anschließend gegen Glycerin dialysiert und in dieser Form bei -20°C gelagert.

Enzymtest:

Die Menge ADP,die pro Std. zu Polyadenylsäure polymerisiert wird,wurde als Maß für die Aktivität des Enzyms genommen.

Test-Lösung: 140 mM Tris
10 mM $MgCl_2$
0,4 mM EDTA
48 mM ADP
0,32 mM (^{14}C)ADP (1 Ci/Mol)

Nach einer Stunde Inkubationszeit wurde die Lösung auf Papierstreifen(Whatman 3MM)aufgetragen und im Laufmittel C(1:1) entwickelt.Die ausgeschnittenen Startflecken wurden mit Scintillationsflüssigkeit(2,8gPPO und 0,9g POPOP/l Toluol)versetzt und die Radioaktivität bestimmt.1 µMol polimerisiertes ADP/ h entspricht einer Einheit des Enzyms.

Isolierung von Ribonuklease T_1(6) (E.C.2.7.7.26)

1)Adsorption an DEAE-Cellulose,Gradientenelution

500 g Takadiastase wurden durch Zentrifugation(Sorvall RC2-B,2000g,10 min.) in 2l Wasser gelöst und auf eine zuvor mit 0,05M Phosphatpuffer pH 6,9 äquilibrierte DEAE-Cellulose Säule(7,5 x 12 cm)aufgetragen. Eluiert wurde mit zwei linearen Gradienten:

1. Gradient:0,05 -0,2 M Phosphatpuffer pH 6,9je 4 l
2. Gradient:0,2 - 0,3 M Phosphatpuffer pH 6,9 je 2 l

Aktive Fraktionen wurden gesammelt.

2)Konzentrierung

Man verdünnte das aktive Eluat zweifach mit Wasser und trug auf eine DEAE-Cellulose Säule(7,5 x 7 cm),äquilibriert mit 0,1M Phosphatpuffer pH 6,9,die verdünnte Lösung auf.Eluiert wurde mit 0,1 M Phosphatpuffer pH2,8.

3)Entfernung der gefärbten Proteine
Das Konzentrat des letzten Schrittes wurde mit Phosphorsäure auf pH 2,8 gebracht und zehnfach verdünnt.Auf die zur Konzentrierung benutzte Säule,äquilibriert mit 10 mM Phosphatpuffer pH 2,8,wurde aufgetragen und mit 500 ml dieses Puffers nachgewaschen.Der Durchfluß wurde auf pH 7 eingestellt;er enthielt die Enzymaktivität.Das gefärbte Material konnte mit 0,1 M saurem Phosphatpuffer eluiert werden.
4)Erste Chromatographie
Das enzymhaltige Eluat wurde auf pH 7,0 eingestellt und auf eine DEAE-Cellulose Säule(7,5 x 15 cm) aufgetragen, die mit 0,1 M Phosphat pH 6,9 äquilibriert war. Zur Reäquilibrierung mußte nochmals mit zwei Säulenvolumina 0,1 M Phosphat pH 6,9 nachgewaschen werden,Anschließend wurde mit 0,19 M Phosphatpuffer pH 6,9 eluiert.
5) Konzentrierung wie unter 2)
6) Letzte Chromatographie
Das konzentrierte,enzymhaltige Eluat wurde auf eine DEAE-Cellulose Säule(4 x 60 cm) aufgetragen,die mit o,1 M Phosphat-Puffer pH 6,9 äquilibriert war.Eluiert wurde mit o,19 M Phosphat-Puffer pH 6,9.
7)Entsalzung
Das enzymhaltige Eluat wurde auf eine Sephadex G25 Säule (5,8 x 58 cm)aufgetragen und mit Wasser eluiert.
8)Gefriertrocknung
Die salzfreien enzymhaltigen Fraktionen wurden gesammelt und gefriergetrocknet.
Enzymtest:
Pipettierschema: 0,1 ml Enzymlösung
0,25 ml 0,2M Tris/HCl pH 7,5
0,1 ml 0,02M EDTA
0,3 ml H_2O
0,25 ml lösliche RNA(3mg/mlH_2O)
Es wurde 15min.bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 0,25 ml Uranylacetat(0,75% Uranylacetat in 25%iger Perchlorsäure)abgebrochen.Anschließend wurde zentrifugiert und 0,2 ml des Überstandes mit 5ml H_2O verdünnt,Von dieser Lösung bestimmte man die Extinktion bei 260 nm.

Diejenige Menge Enzym,die unter diesen Bedingungen eine Zunahme der Extinktion um eins bei 260nm bewirkt,wird als ein Unit bezeichnet.

Isolierung von Ribosomen aus Escherichia Coli MRE 600(7)

Escherichia Coli MRE 600 wurden in einem Vollmedium gezogen und in der frühen Wachstumsphase geerntet($0,7A_{260}$). Die aus dem Medium abzentrifugierten Zellen wurden bei $-70^{o}C$ gelagert.Zur Aufarbeitung entnahm man 10g Zellen, suspendierte sie bei $4^{o}C$ in 200 ml TMA 50 Puffer und zentrifugierte sie ab(Sorvall RC2-B,GSA-Rotor,8000 Upm, 15 min.).Dieser Waschvorgang wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren und mit 15g Alcoa Pulver in einem auf $-20^{o}C$ gekühlten Mörser verrieben,bis sich eine zähflüssige Masse ergab.Diese Masse wurde mit 20 ml TMA 50 Puffer verdünnt und mit 10 ug DNaseIversetzt.Nach einstündigem Stehen bei $4^{o}C$ wurde zentrifugiert(SS 34,15000 Upm,15min.), das Sediment nochmals in TMA 50 aufgenommen und erneut zentrifugiert.Die vereinigten Überstände zentrifugierte man noch einmal(SS 34,15000 Upm,30min.).Der klare Überstand wurde auf ein 30%iges Sucrosekissen geschichtet (15 ml,30% Sucrose in TMA 50) und im Sorvall T 865 Rotor 14 h bei 35000 Upm zentrifugiert.
Das schwach gelbe Pellet wurde in TMA 6 Puffer aufgerieben und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Isolierung von 70 S "tight couples"

Je 100 A_{260} Ribosomen wurden auf einen isokinetischen Sucrosegradienten(15-33% Sucrose in TMA 6)aufgegeben und im Ausschwingrotor(AH 627,27000 Upm,6 h 40min.) zentrifugiert.Der Gradient wurde ausgepummt und das Sedimentationsprofil photometrisch verfolgt.Die 70S-Ribosomen enthaltenden Fraktionen wurden mit TMA 6 Puffer 1,5 fach verdünnt,auf 10mM $MgCl_2$ gebracht und erneut zentrifugiert (T865,40000 Upm,14 h,$4^{o}C$).Das Pellet wurde in TMA 10 Puffer ohne Merkaptoäthanol aufgerieben und portionsweise in flüssigem Stickstoff eingefroren.
Ausbeute:ca. 50 A_{260}

TMA-Puffer:	20 mM	Tris/HCl pH 7,6
	50 mM	NH_4Cl
	10 mM	Mercaptoäthanol
	0,1mM	EDTA
TMA 50	+50 mM	$MgCl_2$
TMA 10	+10 mM	$MgCl_2$
TMA 6	+ 6 mM	$MgCl_2$

Trennung von 70 S Ribosomen in ribosomale Untereinheiten(8)
Je 100 A_{260} 70 S "tight couples" wurden auf einem isokinetischen Sucrosegradienten (20-36% V_m=210,8 ml) in 0,3 mM $MgCl_2$,50 mM NH_4Cl und 10 mM Tris/HCl pH 7,4 Puffer aufgetragen.Zentrifugiert wurde in einem AH 627 Rotor bei 23000 Upm für 17 h.Das Sedimentationsprofil des Gradienten wurde während des Auspumpens photometrisch verfolgt.Untereinheiten enthaltende Fraktionen wurden gesammelt,zweifach mit Puffer verdünnt und durch Zentrifugation(T 865,40000 Upm,24 h) pelletiert.Die Pellets wurden in dem zur Essigsäureextraktion verwendeten Puffer aufgerieben und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Herkunft der Substanzen
Micrococcus luteus,gefriergetrocknet (Miles,Illinois,USA)
RNase A (Boehringer,Mannheim) E.C.2.7.7.16
RNase T_1(Boehringer,Mannheim) E.C.2.7.7.26
Phosphodiesterase aus Crotalus terr.terr.
(Boehringer,Mannheim)E.C.3.1.4.1.
DNase I (Serva,Heidelberg) E.C.3.1.4.5.
Lysozym (Boehringer,Mannheim)
ADP (Boehringer,Mannheim)
GDP (Boehringer,Mannheim)
UMP (Boehringer,Mannheim)
(8-^{3}H)GDP Ammoniumsalz 15,4 Ci/mmol(Amersham Buchler GmbH &Co KG,Braunschweig)
(2-^{3}H)ADP Ammoniumsalz 15 Ci/mmol (Amersham Buchler GmbH &Co KG,Braunschweig)
Brom(2-^{14}C)essigsäure 50 Ci/Mol (Amersham Buchler GmbH &Co KG,Braunschweig)
4-Nitrophenol (Merck,Darmstadt)

Tri-n-dexylamin (Fluka AG,Buchs,Schweiz)
N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (Serva,Heidelberg)
Palladium-Aktivkohle,10%Pd (Merck,Darmstadt)
Sepharose 4B (Pharmacia,Uppsala,Schweden)
DEAE'Sephadex A-50 (Pharmacia,Uppsala,Schweden)
Sephadex G25 (Pharmacia,Uppsala,Schweden)
Sephadex G15 (Pharmacia,Uppsala,Schweden)
Servacel TEAE 23-Cellulose(Serva,Heidelberg)
DE 52 (Diäthylaminoäthylcellulose) (Whatman Ltd.
Springfield Mill Maidstone Kent England)
Dowex Ionenaustauscherharz Typ 50 WX 8 (Serva,Heidelberg)
N,N'-Methylenbisacrylamid (Serva,Heidelberg)
Natriumdodecylsulfat (Serva,Heidelberg)
Coomassie Brillant Blau R-250 (Serva,Heidelberg)
Quickszint KL372 (Koch Light Laboratories)
L-Cystein,freie Base (Sigma)

2.2. Synthesen

2.2.1. Synthese von 4-Nitrophenyl-uridin-5'-phosphat

Aus 19 mMol 5'-Uridylsäure wurde über das Pyridiniumsalz durch Zugabe von 38 mMol Tri-n-hexylamin das Tri-n-hexylammoniumsalz hergestellt und dreimal mit wasserfreiem Pyridin kodestilliert.185 mMol 4-Nitrophenol und 185 mMol Dicyclohexylcarbodiimid wurden zugesetzt.Das Reaktionsgefäß wurde luftdicht verschlossen und acht Tage im Dunkeln bei Zimmertemperatur aufbewahrt.Dann wurde das Pyridin an der Ölpumpe abgezogen,der Rückstand in 200 ml Methanol suspendiert und der während der Reaktion entstandene Dicyclohexylharnstoff über eine Glasfritte abgesaugt.Das klare Filtrat wurde in der Kälte langsam unter Rühren in 4 l wasserfreien Diäthyläther getropft und der Niederschlag durch Zentrifugation abgetrennt. Durch Chromatographie über eine präparative DEAE-Cellulose Säule(95 x 4 cm,Gradient 2x1,5 l,10mM-0,3M NH_4Ac pH 5 in 40%igem Isopropanol)konnte reines Produkt gewonnen werden.Im Produkt vorhandenes Ammoniumacetat wurde durch wiederholte Gefriertrocknung entfernt.
Ausbeute:2,3g 4-Nitrophenyluridin-5'-phosphat(Ammoniumsalz) ≙ 27% der Theorie

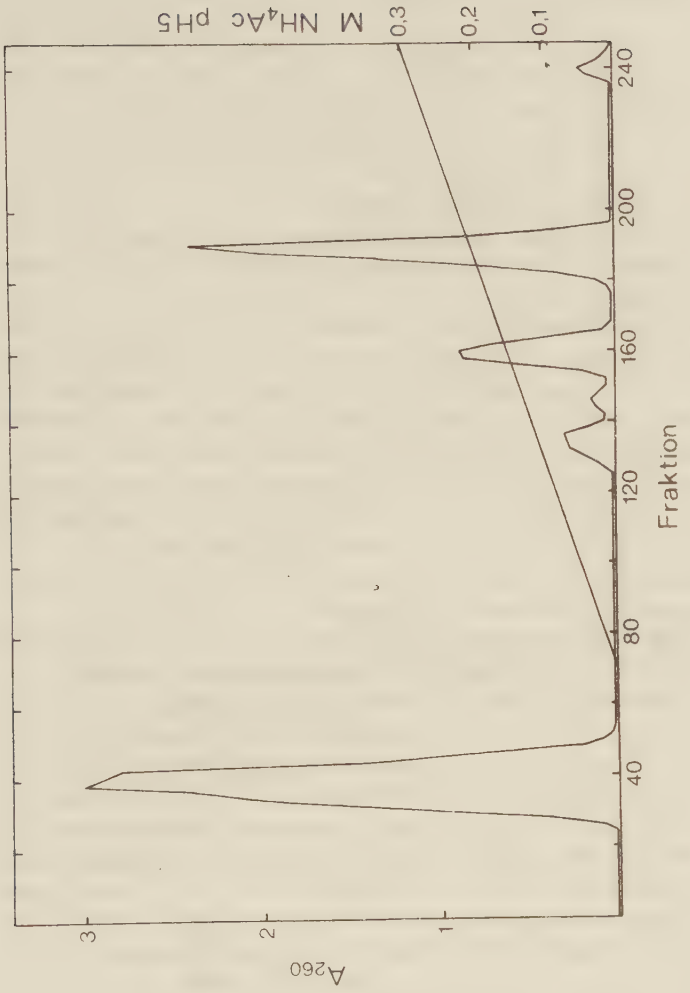


Abb.1: Elutionsprofil des DEAE-Cellulose Säulenlaufs zur praeparativen Reinigung von 4-Nitrophenyl-uridin-5'-phosphat (Säule: 95x4cm, Gradient 2x1,5 l, 10mM-0,3M NH_4Ac, pH 5, in 40%igem Isopropanol)

UV-Spektrum: pH 7 λ_{max}=265 pH 1 λ_{max}=263
pH 13 λ_{max}=265 pH 1 λ_{min}=231
pH 13 λ_{min}=242
R_f in System A = 0,51
B = 0,64
C = 0,71 (NH_4Ac/EtOH 1:1)

2.2.2. Enzymatische Synthesen

5'-(4-Nitrophenylphospho)uridylyl-(3'-5')-guanosin

545 µMol(252 mg) 4-Nitrophenyluridin-5'-phosphat,271µMol (125 mg)GDP und 1 mg RNase T_1 wurden in 15 ml 0,15 M Tris/HCl-Puffer(pH 9,2),5 mM $MnCl_2$ und 0,4 mM EDTA mit Polyribonukleotid-nukleotidyltransferase für 90 h bei 37°C inkubiert.Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 100°C für 2min abgebrochen.10 mg alkalische Phosphatase und $ZnCl_2$ zu einer Endkonzentration von 1 mM wurden zugefügt und 24 h bei 37°C weiterinkubiert.Dann wurde die Lösung auf 250 ml verdünnt und auf eine TEAE-Cellulose Säule (50 x 2 cm),äquilibriert mit 10 mM Triäthyl-ammoniumbicarbonat (pH 7,4),aufgetragen.Nach dem Auswaschen ungeladener Verbindungen mit 10 mM Puffer eluierte man das Produkt mit einem linearen Salzgradienten (2 x 1,2 l,0,01 - 0,3 M Triäthylammoniumbicarbonat Puffer).Fraktionen von 19 ml wurden gesammelt.Das Produkt wurde bei einer Pufferkonzentration von 0,2M eluiert.Die produkthaltigen Fraktionen wurden gesammelt und durch wiederholtes Eindampfen mit Äthanol im Vakuum entsalzt.Der Rückstand wurde in Wasser gelöst und über einen Kationenaustauscher in das Lithiumsalz umgewandelt.

Ausbeute: 14 µMol (5%)
UV-Spektrum: λ_{max} = 256 nm, λ_{min} = 232 nm pH 7
A_{260}/A_{280} = 1,63 ε_M = 21000
R_f in System: C 0,45
R_E (relativ zu UMP): 1,05 (pH 3,5)

5' - (4-Nitrophenylphospho)uridylyl-(3'-5')-guanylyl-(3'-5')-adenosin (III)

7,0 µMol der Verbindung II(trilithiumsalz)und 5 µMol ADP wurden in 1ml 0,4M NaCl,0,17M Tris/HCl pH 9,0, 0,2 mM $MnCl_2$ mit Polynukleotid Phosphorylase 3 h bei 37°C inkubiert.Nach Abbruch der Reaktion durch Erhitzen auf 100°C für 2 min. wurde 1 mg alkalische Phosphatase und $ZnCl_2$ zu einer Endkonzentration von 1 mM zugesetzt. Es wurde 15 h bei 37°C weiterinkubiert,danach das Reaktionsgemisch mit 5ml Wasser verdünnt und auf eine TEAE-Cellulose Säule (20 x 1 cm) gegeben.Die Säule wurde mit 250 ml 0,01 M Triäthylammoniumbicarbonat Puffer gewaschen.Verbindung III wurde eluiert mit einem linearen Salzgradienten (2 x 1 l,0,1-0,45 M Bicarbonatpuffer). Die Fraktionen,die Verbindung III enthielten,wurden gesammelt und entsalzt, wie für Verbindung II beschrieben.
Ausbeute: 1,4 µMol (20%)
UV-Spektrum: pH 7 λ_{max} = 259 nm λ_{min} = 230 nm
A_{260}/A_{280} = 1,90 ε_M = 31400
R_f in System C : 0,37

2.2.3. Reduktion von 5'-(4-Nitrophenylphospho)uridylyl-(3'-5') -guanylyl-(3'-5')-adenosin und Acylierung von 5'-(4-Aminophenylphospho)uridylyl-(3'-5')-guanylyl-(3'-5')-adenosin

2,2'-Dibromo-(2-^{14}C)-Essigsäureanhydrid

8,7 µMol Brom-(2-^{14}C)-essigsäure(57,4 Ci/Mol)wurden in 100 µl trockenem Dioxan gelöst und 7,5 µMol Dicyclohexylcarbodiimid in 75 µl Dioxan zugesetzt.Nach zwei Stunden Reaktionszeit bei Raumtemperatur wurde ausgefallener Dicyclohexylharnstoff durch Zentrifugation abgetrennt. Der Überstand,welcher das Anhydrid enthielt,wurde direkt zur Acetylierungsreaktion eingesetzt.

5'-(4-Aminophenylphospho)uridylyl-(3'-5')-guanylyl-(3'-5')-adenosin(IV)

0,5 µMol der Verbindung III wurden in 500 µl H_2O/MeOH (2:1) gelöst und unter Normaldruck in der Gegenwart von 1 mg Adams Palladium Katalysator hydriert.Die Reaktion war nach 4 h abgeschlossen.Der Katalysator wurde unter N_2Atmos-

phäre abfiltriert, das Filtrat im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde in 175 µl o,1M Phosphat-puffer (pH 6) aufgenommen und ohne vorherige Reinigung in die Acetylierungsreaktion eingesetzt.

5'-((Bromo-(2-^{14}C)-acetamidophenyl)phospho, uridylyl-(3'-5')-guanylyl-(3'-5')-adenosin (V)

0,5 µMol der Verbindung (IV) in 0,1 M Phosphat Puffer (pH 6) wurden mit 4,35 µMol 2,2'-Dibrom-(2-^{14}C)-essigsäureanhydrid(57,4 Ci/Mol) gemischt und für 14 h ins Dunkle bei Raumtemperatur gestellt. Das Reaktionsgemisch wurde auf einen Bogen Whatman 3MM Chromatographiepapier aufgetragen und im Laufmittel B für 40 h entwickelt.

Ausbeute: 150 nMol (30%)

R_f in System B (relativ zu UMP): 0,30

λ_{max} = 256 nm, λ_{min} = 233 nm, A_{260}/A_{280} = 2,2

84% der Verbindung enthielten nach Auswertung mit einem Aminosäureanalysator aktives Brom.

2.3. Biochemische Analysenmethoden

2.3.1. Bestimmung der biologischen Aktivität der Ribosomen Initiationskomplexbildung

Die Aktivitätsbestimmung der Ribosomen beruht in diesem Test auf der Eigenschaft aktiver Ribosomen in Gegenwart von AUG fMet-tRNA$_f^{Met}$ puromycinsensitiv binden zu können. Es wurde bei 37°C 15 min inkubiert und der Komplex über Nitrocellulosefilter(Millipore HAWP 0,45 µ) abfiltriert.

Konzentration in der Lösung:	o,1	ml
Tris/HCl-Puffer pH 7,8	50	mM
$MgCl_2$	7,5	mM
NH_4Cl	100	mM
Merkaptoäthanol	3	mM
GTP	2	mM
AUG	31	µM
70 S Ribosomen	0,29	µM
f(^{3}H)Met-tRNA$_f^{Met}$	1,2	µM
Initiationsfaktoren IF_1,IF_2,IF_3	10	µl

Zur Kontrolle der Reaktion wurden Tests ohne Initiationsfaktoren bzw.AUG durchgeführt.Die Proben wurden nach der Inkubation mit je 2 ml kaltem Puffer (10 mM Tris/HCl(pH 7,8),10 mM $MgCl_2$,30 mM NH_4Cl und 6 mM Mekaptoäthanol)verdünnt,dreimal mit je 2 ml des gleichen Puffers nach der Filtration über Milliporefilter nachgewaschen,schließlich mit 2 ml Äthanol behandelt und getrocknet.Die auf den Filtern zurückgehaltene Radioaktivität wurde bestimmt(Szintillations-Cocktail: 2,8 g PPO und 0,9 g POPOP/l Toluol)

2.3.2. Inkubation von Escherichia Coli-Ribosomen mit *UGA

Affinitätsmarkierung der Ribosomen

Das Reaktionsgemisch enthielt in 0,5 ml 150 A_{260} Einheiten 70 S Ribosomen(7 µM),1,5 A_{260}*UGA(70 µM),6 mM $MgCl_2$,50 mM Tris/HCl(pH 7,4) und 80 mM NH_4Cl.Die Lösung wurde für 2 h bei 37°C inkubiert.Die Reaktion wurde abgebrochen durch Zugabe des doppelten Volumens Puffer (pH 7,4),der 1,3 mM an Mercoptoäthanol war,

Kinetik (Messung der *UGA Aufnahme)

Aus einem Inkubationsgemisch obiger Zusammensetzung wurden in gleichen Zeitabständen Proben mit 1,5 A_{260} 70 S entnommen,mit kaltem Waschpuffer(10 mM $MgCl_2$,50 mM NH_4Cl,10 mM Tris/HCl pH 7,4) 200fach verdünnt und über Millipore Filter filtriert.Es wurde dreimal mit Waschpuffer nachgewaschen(2 ml),danach mit 2 ml Athanol, und die zurückgehaltene Radioaktivität bestimmt.

Kompetitionskinetik mit *UGA und AUG

Dem Inkubationsgemisch der einfachen Kinetik wurde Acetylaminophenyl-AUG zu einer Konzentration von 700 µM zugefügt.Die Durchführung verlief wie oben.

2.3.3. Auftrennung und Charakterisierung ribosomaler Proteine

Proteinextraktion aus Ribosomen(9)

Lösungen von Ribosomen bzw.deren Untereinheiten in TSM-Puffer(10 mM Tris/HCl pH 8,0,3 mM Succinic Acid, 10 mM $MgCl_2$)wurden 100 mM an $MgCl_2$ gemacht und mit dem doppeltem Volumen Eisessig versetzt.Es wurde 45 min heftig auf dem Eisbad gerührt.Das RNA-Präzipitat wurde abzentrifugiert(10 min,2000g),nochmals mit 67%iger Essigsäure versetzt,45 min auf Eis gerührt und pelletiert. Die Überstände,die das ribosomale Protein enthielten, wurden gegen 2%ige Essigsäure dialysiert und gefriergetrocknet.

Elektrophorese ribosomaler Proteine Polyacrylamid-Natriumdodecylsulfat-Gelen (Laemmli Gele,(10)

Die Gellösung (Zusammensetzung siehe Lit.) wurde zwischen zwei Glasplatten(19x16,8x0,3cm),deren Abstand 1,5 mm betrug,gegossen.Zunächst wurde ein 15%iges Trenngel eingefüllt und nach Polymerisation mit einem 5%igen "Spacer Gel" überschichtet.Die Polymerisation wurde mit dem Redox-Katalysatorsystem Ammoniumperoxodisulfat-N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin eingeleitet. Ein Kamm mit zwölf Zähnen,der sofort nach Eingießen des Trenngels zwischen die Platten geschoben wurde,formte im Gel die für die Proben notwendigen Einbuchtungen. Als Referenzproteine wurden aufgetragen:

Protein	Molekulargewicht
Lysozym	14300
Myoglobin	17000
Ovalbumin	46000
Rinderserumalbumin	66300

5 µg/Protein reichten für eine Anfärbung im Gel aus. Von gesamtribosomalem Protein mußten 100-200 µg aufgetragen werden.Die Elektrophorese wurde für 12 h bei 12 mA betrieben.Die Gele wurden 1 h in 0,1%iger Coomassie Brilliant Blau R-250 in 12,5%iger Trichloressigsäure angefärbt und in 7,5%iger Essigsäure mit 20% Methanol entfärbt.Die gefärbten Proteinbanden wurden deutlich sichtbar.

Zweidimensionale Polyacrylamid Gelelektrophorese nach Knopf-Traut (11)

Knopf-Traut Gele stellen eine Modifikation der Wittmann-Methode dar. Im Unterschied zur Wittmann Vorschrift wird die erste Dimension im sauren Bereich betrieben, so daß die Probe nicht in der Mitte des Gels einpolymerisiert werden muß, sondern auf das obere Ende des Gels geschichtet werden kann. Sowohl saure als auch basische Proteine wandern in das Gel.
In die Röhrchen der ersten Dimension (12 x 0,4 cm) wurde auf eine Länge von 9 cm ein 4%iges Acrylamidgel (pH 5,5) gegossen, das 6M an Harnstoff war. Es wurde mit einem "Stacking Gel" (pH 4,5, Länge 1 cm) überschichtet. Die Menge an aufgetragenem 30 S Protein betrug 200 µg. Die Elektrophorese lief 15 h bei 35 Volt (constant voltage).
Nach Beendigung der Elektrophorese der 1. Dimension wurden die Gelwürstchen aus den Röhrchen herausgedrückt und zwischen die Platten der 2. Dimension geklemmt. Nach Abdichten der Platten (Abstand: 1,5 mm, Maße: 19x16,8x 0,3 cm) mit 1%iger Agaroselösung wurde das Trenngel der 2. Dimension eingefüllt, sodaß das eingeklemmte Gelwürstchen am oberen Ende der Platten einpolymerisiert wurde. Der pH war 4,5, die Acrylamidkonzentration betrug 18%. Die Elektrophorese wurde für 12 h bei 15 mA (constant current) betrieben.
Färbe- und Entfärbevorgang war der gleiche wie bei den Lämmli-Gelen beschrieben.

Vorbereitung der Proben

Für die zweidimensionalen Gele wurden nur essigsäureextrahierte Proteine verwendet. Die Proteine wurden mit 100 µl Probenpuffer, der 6M an Harnstoff war, versetzt. Zur Markierung der Lauffront mußte noch Methylenblau zugesetzt werden. Für die Elektrophorese im Laemmli-System konnten auch Lösungen von nicht extrahierten Ribosomen bzw. deren Untereinheiten verwendet werden. 2,5 A_{260} Einheiten 70 S Ribosomen wurden in SDS-haltigem Probenpuffer aufgenommen, mit etwas Bromphenolblau versetzt und 3 min gekocht. Die Proben wurden mit einer Glasspritze auf das Gel aufgetragen.

Geltrocknung,Fluorographie (12)

Enthielten die Gele radioaktiv markierte Proteine, so wurden sie für die Fluorographie vorbereitet. Zunächst wurde das angefärbte Gel zweimal für 30 min mit dem 20 fachen Volumen DMSO behandelt,um es zu entwässern.Danach wurde es für 2 h in 2o%iges PPO in DMSO gelegt und anschließend gewässert(1h).Es folgte die Trocknung des Gels in einer Trockenapparatur unter Ölpumpenvakuum.Das getrocknete Gel wurde in eine Kasette eingeklebt,mit einem X-Omat Film abgedeckt und bei -70°C für die Dauer der Belichtungszeit aufbewahrt.Auf einer Fläche von 1x0,1 cm riefen 200 dpm nach 24 h Belichtungszeit eine Schwärzung auf dem Film hervor.

Radioimmunodiffusion (8)

Diese Tests wurden in Zusammenarbeit mit G.Stöffler vom Max-Planck Institut für Molekulare Genetik durchgeführt.
Glasplatten(12 x 8,5 cm) wurden mit Chromschwefelsäure gereinigt,mit destilliertem Wasser und anschließend mit Aceton gewaschen.Die Platten wurden dann auf eine horizontale Unterlage gelegt.Eine Agaroselösung(1,5%) in Natriumbarbital Puffer(pH 8,6),die 0,75 M an LiCl war und 0,01% Cialit gegen Bakterienwuchs enthielt,wurde angefertigt.Die Agaroselösung wurde so auf die Glasplatten gegossen,daß eine 3 mm dicke Schicht entstand. Nach dem Erstarren des Gels wurden die Löcher ausgestanzt.25 µg 30 S Protein wurde in die zentralen Löcher gefüllt.Antiseren gegen sämtliche 30 S Proteine wurden in die peripheren Löcher gefüllt.Die Immunodiffusion wurde bei 4°C für 24-48 h ausgeführt.Danach wurden die Platten unter Rühren mit 0,01M Tris/HCl pH 7,8,1M KCl gewaschen und der Waschpuffer alle 6-8 h gewechselt.Der Vorgang wurde 10mal wiederholt.Von den so vorbehandelten Platten wurden Autoradiogramme angefertigt.Die Expositionszeit betrug 12-34 Tage.

Aminosäureanalyse markierter Ribosomen

Zur Bestimmung der mit *UGA markierten Aminosäuren wurden 70 S Ribosomen nach zweistündiger Inkubation mit *UGA und Einfrieren für die Aminosäureanalyse vorbereitet. 3,5 A_{260} 70 S Partikel (17500 cpm) wurden in 6M HCl bei 110°C für 24 h im Vakuum hydrolisiert. HCl wurde abgedampft und der Rückstand in 0,2M Natriumcitrat Puffer (pH 2,2) gelöst. Die Aminosäureanalyse wurde mit einem BC200 Aminosäureanalysator (LKB, München, F.R.G.) ausgeführt. Das Eluat wurde in 0,53 ml Fraktionen/min gesammelt, 1 ml Äthyleneglycolmonomethyläther und 5 ml "liquid scintillator" (No. KL372, Koch-Light Lab., Colnbrook, Bucks, England) wurden jeder Fraktion zugefügt und die Radioaktivität bestimmt. Die eingesetzte Radioaktivität wurde vollständig wiedergefunden.

3. Ergebnisse

3.1. Synthese und Charakterisierung von *UGA

Die Synthese von 5'-((4-Bromo-(2-^{14}C)-acetamidophenyl) phospho)uridylyl-(3'-5')guanylyl-(3'-5')-adenosin ist von zwei unterschiedlichen Methoden gekennzeichnet. Der erste Abschnitt zur Synthese des Trinukleotids verlief über eine chemische Synthese von 4-Nitrophenyl-uridin-5'-phosphat, während im zweiten Abschnitt das Produkt der chemischen Synthese enzymatisch verlängert wurde zum Trinukleotid. Es folgten Reduktion und Bromacetylierung des nitrophenylierten Trinukleotids. Das Endprodukt der Synthese 5'-((4-Bromo-(2-^{14}C)-acetamidophenyl)phospho)uridylyl-(3'-5')- guanylyl-(3'-5')-adenosin wird im Folgenden als *UGA abgekürzt.

Klassische Methoden zur Identifizierung und Analyse von *UGA und den Zwischenprodukten der Synthese, wie Kernresonanzspektroskopie und Massenspektroskopie, ließen sich nicht anwenden, weil die synthetisierten Substanzen nicht in ausreichender Menge zur Verfügung standen. Die Verbindungen wurden deshalb papierchromatographisch und papierelektrophoretisch auf Grund ihrer gegenüber der Ausgangsverbindung unterschiedlichen R_f- und R_E- Werte identifiziert. Die Analyse erfolgte durch vollständige enzymatische Hydrolysen zu identifizierbaren Bruchstücken. Die Reinheit der Substanzen wurde durch Papierchromatographie in mindestens zwei Fließmittelsystemen überprüft. Ein weiteres Reinheitskriterium war das UV-Spektrum.

Der erste Schritt der Synthese, die Darstellung des 4-Nitrophenyl-uridin-5'-phosphats, wurde in Anlehnung an Khoranas Synthese von 4-Nitrophenyl-deoxythymidin-5'-phosphat(13) durchgeführt. 5'-Uridinmonophosphat wurde als Tri-n-hexylammoniumsalz in wasserfreiem Pyridin mit 4-Nitrophenol durch N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid kondensiert. Um die Bildung von Nebenprodukten, wie die des symetrischen Pyrophosphats von 5'-Uridinmonophosphat, weitgehend zu unterdrücken, wurden 4-Nitrophenol in 10-fachem Überschuß in die Reaktion eingesetzt. Mit

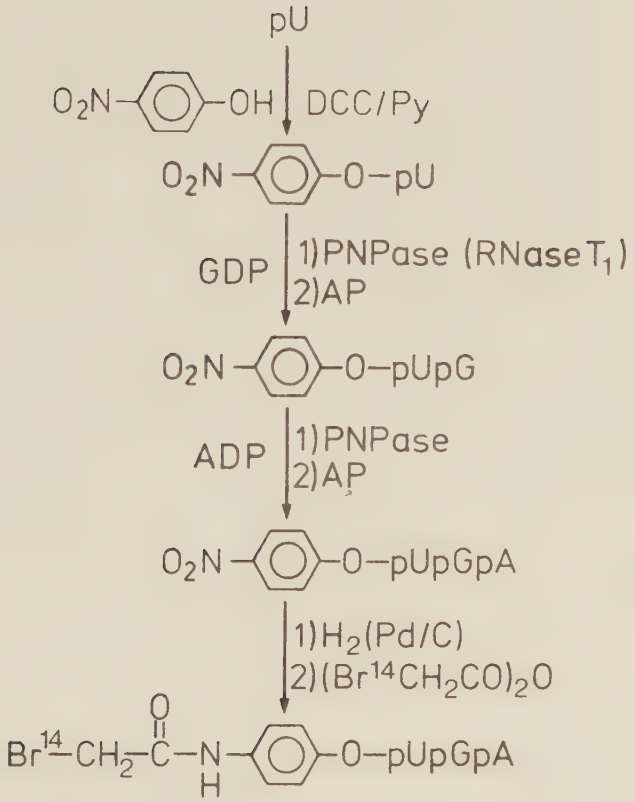


Abb.2:Syntheseschema zur Darstellung von 5'-((Bromo-(2-^{14}C)-acetamidophenyl)phospho)uridylyl-(3'-5')-guanylyl-(3'-5')-adenosin

PNPase = Polynukleotid-Phosphorylase
AP = Alkalische Phosphatase
DCC = Dicyclohexylcarbodiimid
Pd/C = Palladium-Aktivkohle Katalysator

Hilfe der Säulenchromatographie über TEAE-Cellulose konnten Ausgangsverbindungen und Nebenprodukte in einem Lauf vom Reaktionsprodukt abgetrennt werden. Die Ausbeute war 27% der Theorie.

Die Struktur des erhaltenen Reaktionsprodukts wurde durch enzymatische Hydrolyse mit Phosphodiesterase aus Schlangengift sichergestellt.Die chromatographisch nachgewiesenen Produkte der enzymatischen Spaltung waren Nitrophenol und 5'-Uridinmonophosphat.Da Phosphodiesterase aus Schlangengift in einem definierten Spaltungsmechanismus aus Phosphodiesterverbindungen 5'-Nukleosidphosphate freisetzt,konnte es sich bei der synthetisierten Substanz nur um 4-Nitrophenyluridin-5'-phosphat handeln.
In der Literatur sind auch andere Wege zur Synthese dieser oder analoger Verbindungen beschrieben.So hat Moffat et al. 4-Nitrophenyl-uridin-5'-phosphat durch Kondensation des 2',3'-geschützten Nukleosids mit Di-4-Nitrophenylhydrogenphosphat und Di-4-Tolylcarbodiimid in wasserfreiem Dioxan synthetisiert(14).Zur Synthese von 4-Nitrophenyl-deoxythymidin-5'-phosphat setzten Glinski et al. 3'-geschütztes Deoxythymidin und Phosphorsäure-bis-(4-nitrophenyl)esterchlorid ein(15). Diese Synthesen sind jedoch durch das erforderliche geschützte Nukleosid erschwert und ergeben zudem noch unerwünschte Nebenprodukte,so daß der hier gewählte Syntheseweg am sinnvollsten erschien.

Die folgenden Schritte zur Darstellung des Trinukleotids wurden enzymatisch durchgeführt.Eine chemische Synthese der Verbindung wäre äußerst aufwendig gewesen und hätte nur den Vorteil größerer Substanzmengen geboten.Da jedoch die Markierungsversuche an Ribosomen nur Substanzmengen im nMol-Bereich erfordern,konnte auf eine aufwendige chemische Synthese verzichtet werden.

Das Enzym Polynukleotid-Phosphorylase hat die Eigenschaft,an Substrate,die zumindest aus Dinukleotideinheiten bestehen müssen,Nukleotide zu binden,wenn sie in Form von 5'-Nukleosiddiphosphaten dem Reaktionsmedium zugesetzt werden.

Es wurden Vorversuche.sog. Optimierungsversuche,durchgeführt,die klären sollten,ob und in welchem Ausmaß auch 5'-(4-Nitrophenyl)ester von Nukleotiden dem Enzym als Substrat für die Kettenverlängerung dienen können.Die Versuche fielen positiv aus,zeigten aber, daß auch bei Änderung der Salz- und Substratkonzentrationen die Ausbeuten nie höher als 5-7% lagen. Die Reaktion wurde unter dem Einfluß verschiedener Metallionen verfolgt.Getestet wurden Magnesium,Mangan und Kobalt bei unterschiedlichen Konzentrationen.Der Einfluß von NaCl auf die Kettenlänge des synthetisierten Produktes wurde untersucht.Die Inkubationszeit wurde im Bereich von 2 bis 60 Stunden variiert.Schließlich wurde noch der Einfluß des Konzentrationsverhältnisses Substrat/Reagens auf die Ausbeute der Reaktion untersucht.Die Reaktion wurde auch unter unterschiedlichen pH-Bedingungen durchgeführt.

Optimierungsschema:

$NO_2C_6H_4$-p-U	(mM)	5
GDP	(mM)	1,5;5;15
Mg^{2+}	(mM)	2;5;10;50
Mn^{2+}	(mM)	2;5;10;50
Co^{2+}	(mM)	2;5;10;50
NaCl	(mM)	0;300
t	(h)	2;6;16;60

Die besten Ergebnisse konnten bei Verwendung von Mn^{2+} (5 mM) erzielt werden.Hierbei ergab sich eine Ausbeute bis zu 7% bei Inkubationszeiten von 60 h. Bei Einsatz von Mg^{2+} lag die Syntheserate bei 3-5%. Co^{2+} unterdrückte die Reaktion ganz.Die Änderung der Salzkonzentrationen hatte keinen wesentlichen Einfluß auf die Ausbeute der Reaktion.Ein Einfluß von NaCl auf die Kettenlänge (16) konnte nicht bestätigt werden. Eine Änderung des pH-Wertes im Bereich des Wirkungsoptimums der Polynucleotid-Phosphorylase hatte keinen Einfluß auf die Reaktion.

Ein weiteres Problem der Enzymreaktion,nämlich die Kettenverlängerung um mehr als ein Glied,konnte durch Zusatz spezifischer RNasen behoben werden.Als Reaktionsprodukt entstand dann ausschließlich die um das erwünschte Nukleotid verlängerte Kette.
Im ersten Schritt der enzymatischen Synthese wurde an das Startermolekül 4-Nitrophenyl-uridin-5'-phosphat Guanylsäure in Gegenwart von RNase T_1 angeknüpft.Das nach der RNase-Einwirkung verbleibende 3'-Phosphat am Guanylrest der Verbindung wurde mit alkalischer Phosphatase abgespalten,so daß die um einen Guanylrest verlängerte Verbindung 5'-(4-Nitrophenyl)phosphouridylyl-(3'-5')-guanosin isoliert werden konnte.
Da für die Anknüpfung des dritten Nukleotids,der Adenylsäure,keine spezifisch schneidende RNase gefunden werden konnte,mußte versucht werden,die Homopolymerisation durch geeignete Reaktionsbedingungen zu unterdrücken. Die Reaktionsbedingungen für die herkömmliche Polynukleotid-Phosphorylase-Reaktion,wonach durch Kettenverlängerung eines Startsubstrats mit Nukleosid-5'-diphosphaten ein Oligonukleotid synthetisiert wird, ist von Thach (16) umfassend beschrieben worden.Das Startglied ist immer ein Dinukleosid-(3'-5')-monophosphat,das mit Nukleosid-5'-diphosphaten unter Phosphatabspaltung zu einem Oligomeren verlängert wird.Es wurde gezeigt,daß Polynukleotid-Phosphorylase auch dann Homopolymerisation katalysiert,wenn Substrat oder Diphosphat an der Base oder der L-Ribose modifiziert sind.So kann Polynukleotid-Phosphorylase auch zur Synthese von Oligodesoxynukleotiden eingesetzt werden(17).Auch Synthesen mit 2',3'-geschütztem Nukleosid-5'-diphosphat sind beschrieben(18).Wie hier gezeigt wurde,muß das Startsubstrat auch kein Dinukleosid-(3'-5')-monophosphat sein,ein drastisch modifizierter Phosphorsäurediester,das 4-Nitrophenyl-uridin-5'-phosphat, genügt ebenfalls den Ansprüchen des Enzyms.
Für die Anknüpfung von Adenylsäure an $O_2NC_6H_4$pU-G wurden Konzentrationsverhältnisse gewählt,unter denen bevorzugt um ein Nukleotid verlängert wurde.Das Ver-

hältnis Starter : Nukleosiddiphosphat war 1:o,7.
Unter diesen Bedingungen konnte eine Ausbeute an Trinukleotid von 20% erzielt werden.

Zur Sicherung der Primärstruktur wurden folgende Versuche durchgeführt:

1) RNase T_1 spaltet das Trinukleotid zu $O_2NC_6H_4$pU-Gp und A

$$O_2NC_6H_4pU\text{-}G\text{-}A \xrightarrow{\text{RNase } T_1} O_2NC_6H_4pU\text{-}Gp + A$$

2) Phosphodiesterase aus Schlangengift setzte in Verbindung mit alkalischer Phosphatase die drei Nukleoside frei:

$$O_2NC_6H_4pU\text{-}G\text{-}A \xrightarrow[2)\ AP]{1)\ PDE} O_2NC_6H_4OH + U + G + A$$

3) RNase A spaltet in $O_2NC_6H_4$pUp und GpA

Die freigesetzten Nukleoside wurden über eine Nukleosidanalysatorsäule bestimmt.
Damit war die auf Grund der Syntheseschritte zu erwartende Struktur der Verbindung gesichert.
Die Bromacetylierungsreaktion konnte mit einem Aminosäureanalysator überprüft werden.Hierzu wurde das bromacetylierte Produkt mit Cystein umgesetzt unddas nach Hydrolyse in 6M HCl abgespaltene Carboxymethylcystein mit dem Analysator bestimmt.Es wurde festgestellt,daß 84 % der eingesetzten Verbindung reaktives Brom enthielt.Die Überprüfung der Nukleotidzusammensetzung der bromacetylierten Verbindung stimmte mit dem obigen Ergebnis überein.

3.2. Reaktionen von *UGA mit Ribosomen aus Escherichia Coli

Die Zeitabhängigkeit der Bindung von *UGA an Ribosomen wurde gemessen.Dabei wurde ein Konzentrationsverhältnis von 70S/*UGA=1/10 gewählt.Das Reaktionsgemisch enthielt 70S "tight couples"(7 µM),*UGA(70 µM),6 mM $MgCl_2$,50 mM Tris/HCl(pH 7,4) und 80 mM NH_4Cl.Die Lösung wurde für zwei Stunden bei 37°C inkubiert,nach in Abb.3 angezeichneten Zeitabständen wurden 1,5 A_{260} 70S Ribosomen entnommen, mit Waschpuffer verdünnt und über Millipore Filter filtriert.Die Filter wurden getrocknet und die zurückgehaltene Radioaktivität bestimmt.Die Kurve für die Aufnahme von *UGA erreichte nach 1,5 h ein Plateau.Der Plateauwert zeigte eine Bindung von 2Mol*UGA/Mol 70S an.Versetzte man die Reaktionslösung in einer Kompetitionskinetik mit dem gegenüber der Ribosomenkonzentration 100fachen Überschuß an $AcNHC_6H_4p$-AUG bei gleichbleibender *UGA-Konzentration,so ergab die Messung gebundenen *UGAs Werte,die nicht über 0,35 Mol*UGA/Mol 70S nach 2 h Reaktionszeit hinausgingen.

Nach der Definition von Noll et al.(19) lassen sich Ribosomen in "tight couples" und "loose couples" klassifizieren.Als "tight couples" bezeichnet man Ribosomen,die sich bei 3-4mM $MgCl_2$ noch nicht in Untereinheiten trennen lassen,während "loose couples" bei dieser $MgCl_2$-Konzentration bereits in Untereinheiten zerfallen.Durch längeres Stehenlassen auf Eis oder durch langsames Einfrieren wandeln sich "tight couples" in "loose couples" um.Ein zusätzlicher Versuch wurde unternommen,festzustellen,ob Ribosomen nach dieser Konformationsänderung in der Lage sind *UGA weiter aufzunehmen.Proben wurden nach zweistündiger Inkubation bei 37°C eingefroren (-20°C für 2 h),danach nochmals 30 min. inkubiert(37°C) und die *UGA-Aufnahme gemessen. Der Meßwert war der gleiche wie nach zweistündiger Inkubation.

In einem Vorversuch wurden 70S Proben nach 2 h Inkubationszeit(mit und ohne Einfrieren)RNase behandelt und die Proteine in einem Laemli-Gel aufgetrennt.Es wurde eine Autoradiographie angefertigt und das Markierungsmuster der beiden unterschiedlich behandelten Proben (mit und ohne Einfrieren) verglichen.Dabei zeigte sich, daß die nichteingefrorene Probe auf dem Gel im Bereich von Protein S18 Radioaktivität enthielt,während die eingefrorene Probe zwei Markierungsstellen zeigte,im Bereich von S18 und S4.Die Autoradiographie zeigte bei beiden Proben noch im Bereich von S1 Markierung.
Dies war ein erster Hinweis darauf,daß durch Einfrieren zusätzlich ribosomale Proteine markiert werden.
Es wird angenommen,daß nach Einfrieren das Ribosom zwar nicht in der Lage ist,zusätzlich *UGA aufzunehmen, aber durch die Konformationsänderung Protein S4 bisher nicht reagiertem Reagens zugänglich wird.

Zur Identifizierung der markierten Aminosäuren wurden Proteinproben aus den Ansätzen mit und ohne Einfrieren in 6M HCl hydrolisiert und über einen Aminosäureanalysator die markierte Aminosäure bestimmt.Es zeigte sich, daß fast ausschließlich Cystein radioaktive Markierung trug.In der eingefrorenen Probe entfielen 94% der Markierung auf CM-Cys,1% auf 3-CM-His und 5% auf 1-CM-His. (siehe Diagramm)

3.3. Identifikation der mit *UGA markierten Proteine

Zur Identifikation der mit *UGA reagierten Proteine wurden in einem Inkubationspuffer 150 A_{260} Einheiten 70S Ribosomen(7 µM) in einem Volumen von 0,5 ml mit 1,5 A_{260} *UGA(70 µM) 2 h bei 37°C inkubiert.Danach wurde der Ansatz halbiert,ein Teil 2 h bei -20°C eingefroren und nochmals 30min. bei 37°C inkubiert.Die Reaktion wurde durch Zugabe des doppelten Volumens an Puffer,der Mercaptoäthanol(1,3 mM) enthielt,gestoppt. Beiden Proben wurden noch je 25 A_{260} 70S Ribosomen zugesetzt,so daß je 100 A_{260} 70S Ribosomen auf den Gradienten zur Trennung in die Untereinheiten geschichtet werden konnten.

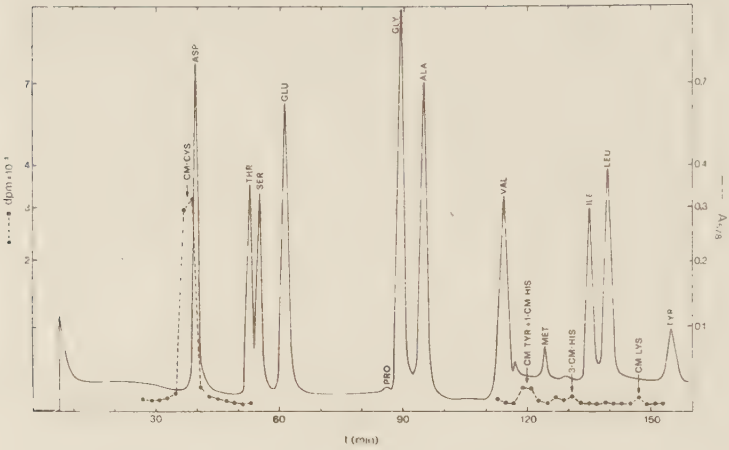


Diagramm zur Identifizierung der markierten Aminosäuren.

3,5 A_{260} Einheiten 70S Ribosomen (nach Einfrieren) wurden in 6M HCl hydrolisiert (24 h,115°C);das Reaktionsgemisch im Vakuum zur Trockene eingedampft und in Probenpuffer aufgenommen.Es wurde getrennt über einen BC 200 Aminosäureanalysator.Fraktionen von 0,53 ml/min wurden gesammelt und die Radioaktivität bestimmt.

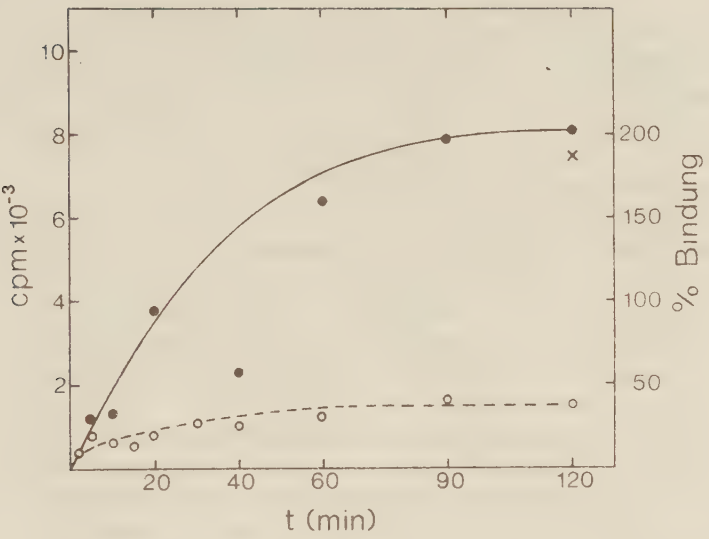


Abb.3: Zeitabhängigkeit der *UGA-Aufnahme

____ unter nicht konkurrierenden Bedingungen

---- unter konkurrierenden Bedingungen (Kompetition)

a) Das Reaktionsgemisch enthielt 70S "tight couples" (7 µM), *UGA (70 µM), 6mM $MgCl_2$, 50 mM Tris/HCl (pH 7,4) und 80 mM NH_4Cl. Pro Messung wurden 1,5 A_{260} entnommen, mit Waschpuffer verdünnt und über Millipore filtriert.

b) Dem Reaktionsgemisch von a) wurde Acetylamino-phenyl-AUG zu einer Konzentration von 700 µM zugefügt.

x Meßwert nach zweistündiger Inkubation, langsamen Einfrieren der Probe, Wiederauftauen und nochmaliger Inkubation für 30 min..

3.3.1. Gradientenanalyse der reagierten Ribosomen

Die Inkubationsansätze wurden zur Trennung der 70S Ribosomen, die mit *UGA reagiert hatten, in die 30S- und 50S-Untereinheiten auf einen isokinetischen Sucrose-Gradienten (20-36%) geschichtet und 17 h bei 23000 Upm zentrifugiert. Die $MgCl_2$-Konzentration im Gradienten war 0,3 mM.
Nach der Zentrifugation wurden die Gradienten ausgepumpt und in 2 ml-Fraktionen gesammelt. 50 µl pro Fraktion wurden mit 5 ml Quickscint versetzt und die ^{14}C-Radioaktivität bestimmt. Abb. 4,5 zeigen, daß hauptsächlich die 30S-Untereinheiten mit *UGA reagiert hatten, da hier der größte Teil der ^{14}C-Radioaktivität wiedergefunden wurde.
Die Untereinheiten wurden durch Zentrifugation pelletiert und in einem kleinen Volumen Puffer aufgerieben. Das cpm/A_{260}-Verhältnis der 30S-Partikel war 5000 cpm/A_{260} 30S. Berücksichtigt man, daß 25% der Ribosomen erst nach gestoppter Inkubation zugesetzt wurden, so trugen ca. 85% der 30S Partikel kovalent gebundenes *UGA.

3.3.2. Elektrophoretische Analysen markierter ribosomaler Proteine

Die Identifikation der markierten ribosomalen Proteine mit elektrophoretischen Methoden wirft Probleme auf, die zunächst diskutiert werden sollen. Die Trennung ribosomaler Proteine mit Hilfe der Polyacrylamidelektrophorese kann auf Grund der unterschiedlichen Molekulargewichte oder der verschiedenen Ladung erfolgen. Zur Trennung nach Molekulargewichten bieten sich Polyacrylamidelektrophoresen in Natriumdodecylsulfat (SDS) an. Die zweidimensionale Elektrophorese nach Kittmann oder in einem modifizierten System nach Knopf Traut trennt nach Ladung und Molekulargewicht. Beide Systeme sind zur Trennung ribosomaler Proteine, besonders der 21 Proteine der 30S Untereinheit, hervorragend geeignet und zeigen reproduzierbare Ergebnisse. Im Laemli System machen sich lediglich im unteren Molekulargewichtsbereich eine zunehmende Unschärfe der Banden störend bemerkbar, so daß

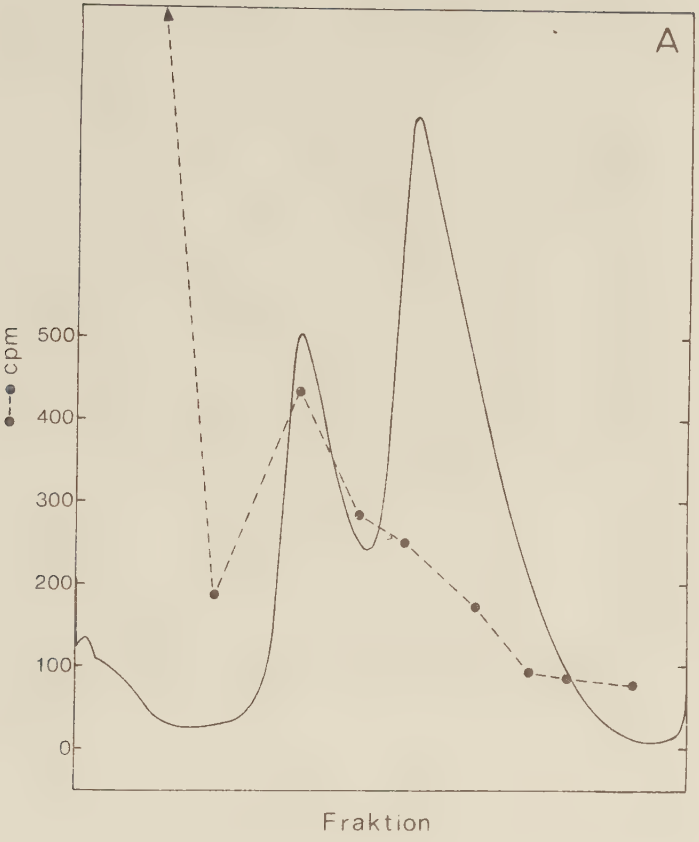
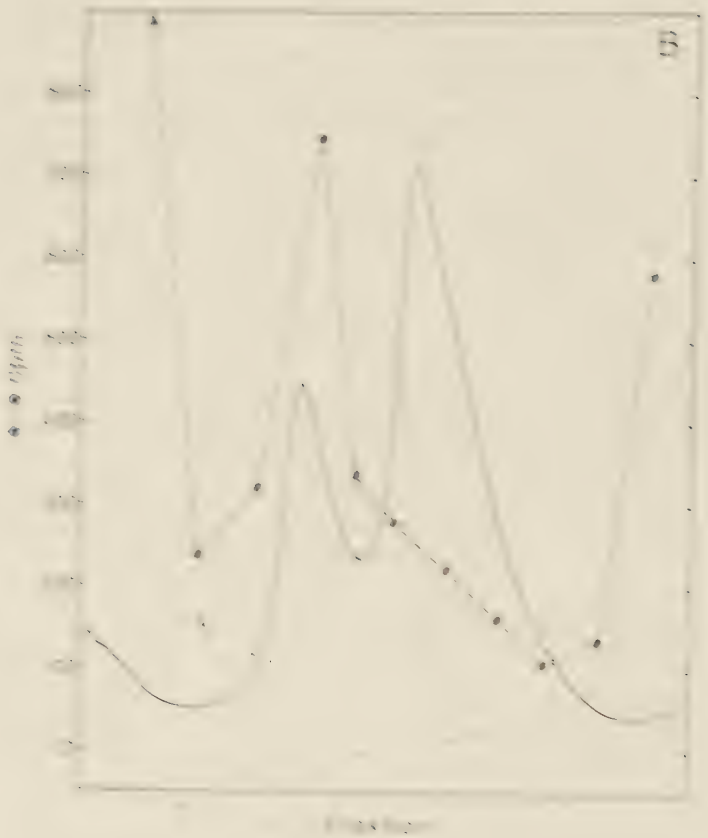


Abb.4: Gradientenanalyse der ribosomalen Untereinheiten
Ansatz mit nichteingefrorenen Ribosomen


B

die Zuordnung der Banden S18-S21 erschwert ist.Im zweidimensionalen System werden die Proteine S15,S16 und S17 unzureichend getrennt.Bei der Trennung der markierten ribosomalen Proteine treten jedoch Probleme auf,die eine Identifizierung erschweren.Durch die Markierung mit *UGA verändert sich sowohl die Ladung, als auch das Molekulargewicht des markierten Proteins. Das hat zur Folge,daß in beiden Systemen sich die Laufeigenschaften des markierten Proteins ändern und somit eine eindeutige Zuordnung nicht mehr möglich ist. Die Gelelektrophorese erweist sich deshalb für das vorliegende Problem als einfache Methode,die Zahl der markierten Proteine unter unterschiedlichen Inkubationsbedingungen zu bestimmen und eine ungefähre Zuordnung zu geben.Eine eindeutige Zuordnung kann dagegen erst durch zusätzliche Radioimmunotests erzielt werden.

Proben der isolierten 30S- und 50S Untereinheiten, sowie der Überstände aus der Gradientenzentrifugation in die Untereinheiten,wurden im Laemli-System elektrophoretisiert und eine Autoradiographie angefertigt. Es ergab sich für die 30S Proteine,die ohne Einfrieren inkubiert waren,eine radioaktive Bande im Bereich von S18,während die 30S Proteine,die nach der Inkubation eingefroren worden waren,eine zusätzliche radioaktive Markierung im Bereich von S4 zeigten.Die Autoradiographie der 50S Banden zeigte keinen wesentlichen Einbau von Radioaktivität in Protein.Wie bei den 30S Proteinen war im Bereich S18 (ohne Einfrieren) und S18 und S4 (mit Einfrieren) eine leichte Schwärzung des Films zu erkennen.Daraus kann geschlossen werden, daß die 50S Partikel der Gradientenzentrifugation noch markierte 30S Partikel enthielten.Die Autoradiographie der Überstände zeigte ebenso wie die der 30S Partikel in geringem Ausmaß markiertes Protein S1.
Abb.6,7

Zur Elektrophorese im zweidimensionalen System nach Knopf Traut mußten die Proteine der 30S Untereinheiten zunächst mit Essigsäure extrahiert werden.Die dabei ausgefällte ribosomale RNS wurde wieder aufgelöst und

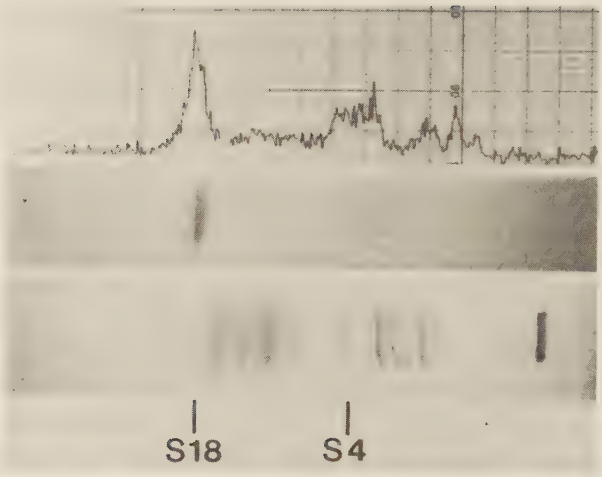


Abb.6:

Unterer Streifen: Acrylamidgel von 70S Proteinen
Mittlerer Streifen: Autoradiographie des unteren Gelstreifens
Oben: Scanaufnahme der ^{14}C-Radioaktivität des unteren Gelstreifens

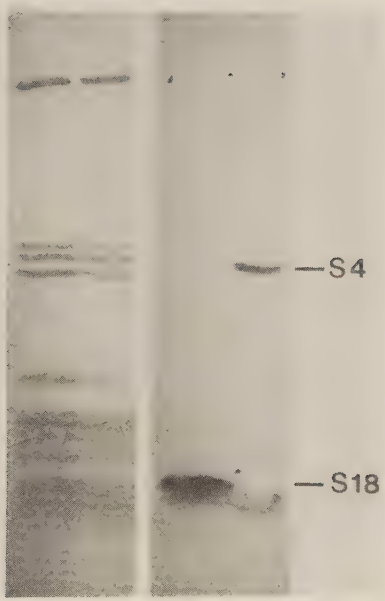


Abb.7:Links:Laemmli-Gel der isolierten 30S Untereinheiten(Probe mit und ohne Einfrieren)
Rechts:Autoradiographie des Laemmli-Gels
Linker Teil:nicht eingefrorene Probe
Rechter Teil: eingefrorene Probe

auf Radioaktivität überprüft.Die Messung zeigte,daß keine Radioaktivität in der gelösten RNS enthalten war.Somit konnte geschlossen werden,daß mit *UGA ausschließlich Proteine markiert wurden.
Die lyophilisierten Proteine wurden für die zweidimensionale Elektrophorese mit der gleichen Menge an unmarkierten 30S Proteinen versetzt.Durch Inkubation der gelösten Proteine mit Phosphodiesterase aus Schlangengift wurde versucht,das den markierten Proteinen anhängende Trinukleotid abzuspalten und damit die Veränderung der Laufeigenschaften durch zusätzliche Ladungen und höheres Molekulargewicht zu verhindern.
Wie zu den Gelen nach Laemli wurden 30S Proteine verwendet,die auf unterschiedliche Weise markiert worden waren.Die eine Probe enthielt Proteine aus 30S Partikeln,die zwei Stunden mit dem Affinitätslabel inkubiert worden waren,die andere Probe enthielt Proteine aus 30S Partikeln,die noch zusätzlich auf -20°C eingefroren worden waren.Von beiden Proben wurden zweidimensionale Gele angefertigt.Die angefärbten Gele der zweiten Dimension zeigten Proteinmuster, die den Literaturangaben entsprachen.Von beiden Gelen wurde eine Autoradiographie angefertigt.Die Autoradiographie des Gels mit der Probe,deren 30S Partikel eingefroren worden waren,zeigte mehrere Schwärzungen.
Eine Gruppe von drei Flecken,die sich von Protein S18 nach S15 in Richtung Start ersteckte,wurden als Abbauprodukte der unvollständigen Phosphodiesterase Reaktion angesehen und einem Protein (S18) zugeordnet.Darunter lagen vier Flecken;sie wurden dem Protein S21 zugeordnet.
Im Bereich von S4 lag noch ein weiterer gut sichtbarer Fleck und ein darüberliegender schwächerer.Beide wurden zu Protein S4 gehörig betrachtet.Durch unvollständige Abbaureaktion der Phosphodiesterase kann das dem markierten Protein anhängende Trinukleotid schrittweise abgebaut vorliegen,so daß sich insgesamt vier in Ladung und Molekulargewicht unterschiedliche Spaltungsprodukte ergeben können.

Abb.8: 2D Gele und Autoradiographien der 30S Proteine
(eingefrorene und nicht eingefrorene Proben)
oben links: 2D Gel der 30S Proteine(eingefroren)
oben rechts: Zugehörige Autoradiographie
unten links: 2D Gel der 30S Proteine(nicht eingefrorene Probe)
unten rechts: Zugehörige Autoradiographie

Die Autoradiographie des Gels mit der Probe,deren 30S Partikel nur bei 37°C inkubiert waren,zeigte zwei dicht beieinanderliegende Schwärzungen.Sie waren gegenüber der Lage des unmarkierten Proteins S18 in Richtung S15 verschoben(siehe Abb.8).
Wie aus obiger Darstellung hervorgeht,konnten die Proteine mit Hilfe der Methode der Gelelektrophorese nur ungefähr zugeordnet werden.Es mußte demnach nach einer Methode gesucht werden,die eine eindeutige Identifizierung der markierten Proteine erlaubte.

3.3.3. Antikörperreaktion(20)

Als sicherste Methode zur Identifizierung der markierten Proteine wurde die Immunodiffusion nach Ouchterlony angesehen.Hierzu werden in ein Agarosegel,das auf eine Glasplatte geschichtet ist,Löcher gestanzt,wobei ein zentrales Loch von einer unterschiedlichen Anzahl Löchern im gleichen Abstand umgeben ist.In das zentrale Loch wird eine Lösung der 30S Proteine eingefüllt, während die umgebenden Löcher mit gegen bestimmte Proteine spezifischen Antiseren gefüllt werden.Diffundieren Proteine und Antiseren gegeneinander,so bildet sich an ihrem Schnittpunkt ein Präzipitat.War das Protein radioaktiv markiert,so muß auch die Präzipitatlinie Radioaktivität enthalten.Die Radioaktivität kann durch Autoradiographie des Gels bestimmt werden.
Zwei Proben der 30S Proteine(mit und ohne Einfrieren) wurden von G.Stöffler gegen Antiseren aller 21 Proteine getestet.Es zeigte sich,daß eine Probe (ohne Einfrieren) 80% der Radioaktivität in S18 und je 10% in S1 und S21 enthielt.In der anderen Probe (mit Einfrieren) verteilte sich die Radioaktivität zu 2/3 auf Protein S18,zu 1/3 auf S4,schwache Markierung war in S21 enthalten,Protein S1 trug dagegen keine Markierung.Dieses Ergebnis entspricht der Interpretation,die für die Autoradiographien der Gele gegeben wurden.Bemerkenswert ist,daß Protein S21,durch die empfindlichere Methode der Immunodiffusion nachweisbar,auch in der Probe ohne Einfrieren radioaktive Markierung trägt.

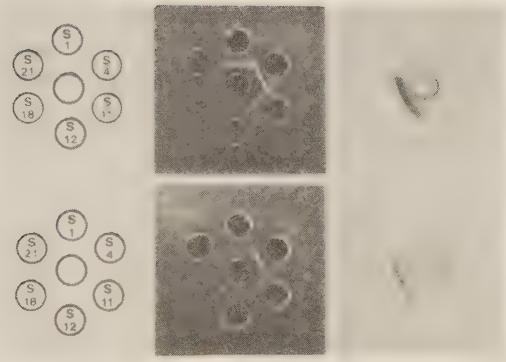


Abb.9: Bestimmung markierter Proteine durch Antikörpertests
30S Gesamtprotein wurde in das zentrale Loch eingefüllt und gegen Antiseren bestimmter ribosomaler Proteine(linkes Bild) diffundiert(Ouchterlony,mittleres Bild).Von den entwickelten Ouchterlonys wurden Autoradiographien angefertigt(rechtes Bild)
Bildreihe oben: Test gegen 30S Proteine der nicht eingefrorenen Probe
Bildreihe unten: Test gegen 30S Proteine der eingefrorenen Probe

Die Quantifizierung der in den Proteinen enthaltenen Radioaktivität ist auf Grund der Schwärzungsintensität der Autoradiographien unzuverlässig.
Abb.9 zeigt die Ergebnisse der Radioimmunodiffusionstests im Bild.
Alle übrigen Proteine zeigten auch bei längeren Expositionszeiten keine Markierung.
Eine Tabelle soll nochmals die aus den Autoradiographien der Gele und die aus den Autoradiographien der Ouchterlonys identifizierten Proteine gegenüberstellen:

		markiert
30S Protein in 2D u.Laemli	ohne Einfrieren	S1,S18
	mit Einfrieren	S1,S4,S18,S21
30S Protein in Ouchterl.	ohne Einfrieren	S1,S18,S21
	mit Einfrieren	S4,S18,S21

4. Diskussion

Bei der Synthese des bromacetylierten Trinukleotids traten unerwartete Schwierigkeiten auf. Es stellte sich heraus, daß Papierchromatographie allein zur Reinigung der synthetisierten Verbindung nicht ausreichend war. Ein Gelfiltrationsschritt erwies sich vor Weiterverwendung der Verbindung als unerlässlich. Zudem mußte jeder einzelne Schritt optimiert werden. Unterschiedliche Salz- und Substratkonzentrationen wurden getestet. Trotzdem lagen die Ausbeuten für den ersten und zweiten enzymatischen Syntheseschritt nicht höher als 7 bzw. 20%. Im Vergleich dazu waren die Ausbeuten für die Synthese von $NO_2C_6H_4$pAU und $NO_2C_6H_4$pAUG 10 bzw. 75%(19). Es ist naheliegend, daß für die Synthese des modifizierten Dinukleotids das Nitrophenylpurin ein besseres Substrat war, als das Nitrophenylpyrimidin. Für die Synthese des Trinukleotids konnte im Falle von Nitrophenyl-AUG eine spezifisch hinter G schneidende RNase eingesetzt werden. Das erklärt die hohe Ausbeute gegenüber der bei Nitrophenyl-UGA angewendeten Methode der statistischen Kettenverlängerung.

Aus der Literatur ist zu entnehmen, daß Ribosomen unterschiedliche Konformationszustände einnehmen können(20). So können 70S Partikel in Form von "tight couples" und "loose couples" vorliegen. Es ist daher nicht verwunderlich, daß die Reaktion von *UGA mit 70S Ribosomen stark von den Inkubationsbedingungen abhängig war. So reagierten Ribosomen nach zweistündiger Inkubation mit *UGA bevorzugt mit Protein S18 und zu einem wesentlich geringeren Teil mit S1 und S21. Nach Einfrieren des Inkubationsansatzes wurde zusätzlich in erheblichem Maße Protein S4 markiert. Diese zusätzliche Markierung kann durch eine Konformationsänderung der Ribosomen erklärt werden, zumal bekannt ist, daß sich durch Einfrieren Ribosomen von "tight couples" in "loose couples" umwandeln.

Die Ergebnisse der Bindungskinetik zeigten, daß nach zwei Stunden Reaktionszeit pro Mol 70S zwei Mole *UGA auf-

genommen werden.Ein Einfrieren des Ansatzes bewirkt keine zusätzliche Aufnahme von *UGA,dagegen findet zusätzliche Quervernetzung des Affinitätslabels mit Protein S4 statt.

Der Nachweis,daß *UGA im Bindungszentrum für die Messenger-RNS des Ribosoms eingelagert wurde und nicht unspezifisch reagiert hatte,konnte mit Hilfe der Kompetitionskinetik geführt werden.Einem der Bindungskinetik identischen Ansatz wurde Acetylaminophenyl-AUG,also ein nicht reaktives Analoges,in einem 100-fachen Überschuß gegenüber der Ribosomenkonzentration zugefügt.Nach zwei Stunden Reaktionszeit hatten 0,35 Mol *UGA pro Mol 70S Ribosomen gebunden. Dieses Ergebnis zeigt,daß das modifizierte AUG Codon mit dem *UGA Codon um eine spezifische Bindungsseite am Ribosom konkurrierte.Unspezifische Bindung von *UGA an das Ribosom wäre von AUG nicht beeinträchtigt worden.

Das Ergebnis der Bindungskinetik überrascht insofern,als in vorangegangenen Bindungsexperimenten mit $BrAcNHC_6H_4p$-AUG(22) nie mehr als ein Mol des Affinitätslabels pro Mol 70S gebunden wurde.Daraus wurde geschlossen,das aktive Zentrum des Ribosoms könne nicht mehr als ein Molekül des reaktiven Triplets aufnehmen,es gäbe demnach nur eine Codon-Anticodon Bindungsstelle im Ribosom.Neuere Arbeiten(23,24) zeigen jedoch eindeutig, daß das Ribosom zwei Codon-Anticodon Bindungsstellen besitzt,entsprechend den zwei tRNS Bindungsseiten in der 50S Untereinheit.Stöffler et al.konnten mit Hexanukleotiden zeigen,daß die codonspezifische Besetzung der P-Seite des Ribosoms Voraussetzung für die anschließende ebenfalls codonspezifische Bindung von tRNS in die A-Seite ist.Oligonukleotide,die kleiner als Hexamere waren,zeigten sich unwirksam in der enzymatisch katalysierten Bindung von tRNS in die ribosomale A-Seite.Es wurde gefolgert,daß die Bindung des aminoacyl-tRNS Komplexes mit GTP und Elongationsfaktoren in die A-Seite nur stattfindet,wenn die P-Seite besetzt ist und die Codon Anticodon Wechselwirkung in dieser Seite beibehalten wird.Das bedeutet,

daß das Ribosom zwei Bindungsseiten hat.
Betrachtet man natürliche Messenger-RNS, so stellt man häufig fest, daß zwei aufeinanderfolgende Terminationscodone das Ende einer für ein Protein codierenden Sequenz anzeigen. Diese Beobachtung kann mit gebotener Vorsicht als Hinweis dafür gewertet werden, daß das Ribosom zwei benachbarte Codone gleichzeitig zu binden und zu lesen vermag.
Proben der Bindungskinetik wurden analysiert, um die mit der Bromacetylgruppe reagierten Aminosäuren zu bestimmen. Hierbei zeigte sich, daß ausschließlich Cystein markiert worden war. Da im Falle der nicht-eingefrorenen Proben Protein S18 als hauptsächlich reagiertes Produkt nur ein Cystein enthält, konnte demnach nur ein Mol des reaktiven Triplets mit einem Mol der Ribosomen reagiert haben. Bestätigt wurde dies durch die Gradientenanalyse. Es zeigte sich, daß nach Trennung der 70S Partikel in die Untereinheiten die 30S Partikel nur noch zu 85% radioaktive Markierung trugen. Die Radioaktivität in den 50S Partikeln betrug nur ein Fünftel dieses Wertes.
Somit konnte mit Hilfe der Filtertechnik die Gesamtmenge kovalent und nicht kovalent gebundenen Triplets bestimmt werden. Nach Trennung der 70S Partikel in die Untereinheiten verblieb dagegen nur noch an die 30S Untereinheiten kovalent gebundenes Triplet. Der Vergleich der so erhaltenen Daten zeigt, daß das Ribosom zwei Moleküle des reaktiven Codons aufzunehmen vermag, aber nur eines davon zu einer chemischen Reaktion mit umgebendem Protein befähigt ist. Wurde der Inkubationsansatz dagegen zusätzlich eingefroren und nachinkubiert, so reagierte ein Teil des bisher nicht kovalent gebundenen Substrats mit Protein S4 ab.
Durch Einfrieren änderte sich die Konformation des Partikels offenbar dahingehend, daß Protein S4 dem bisher nicht reagierten Substrat zugänglich wurde.
Es konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden, welchem Bindungszentrum des Ribosoms die markierten Proteine angehören. Klar ist jedoch, daß alle drei Pro-

teine(S4,S18,S21) in Übereinstimmung mit veröffentlichten Ribosomenmodellen(25) im Bereich der Messenger-RNS Bindungsstellen am Ribosom liegen.Lanka et al.(8) konnten nachweisen,daß kovalent an die Proteine S18 und S4 gebundenes *AUG das Ribosom für die Initiationsfaktor-abhängige Bindung von Initiator-tRNS stimulierte und zwar in die Puromycin-resistente Seite.Das heißt, die Bindungsstelle,an der *AUG auf dem Ribosom reagiert, steht mit der Aminoacyl-tRNS-Bindungsstelle in Zusammenhang.Die Proteine S4 und S18 müssen ebenfalls diesem Bereich zuzuordnen sein.Darüberhinaus ist bekannt,daß diese beiden Proteine am Elongationsschritt beteiligt sind.

Die Bindungsseiten der Proteine an die 16S rRNS ist bekannt.Zimmermann et al.(25) lokalisierten die Bindungsseiten von 12 ribosomalen Proteinen an drei spezifische Regionen von 16S rRNS.Dabei zeigte sich, daß Protein S4 an das 5'-terminale Fragment,S18 mit dem zentralen Bereich und S21/S1,obwohl in keinem Fragment enthalten,durch Quervernetzung an das 3'-Ende der 16S rRNS gebunden werden kann.Offensichtlich ist die RNS so gefaltet,daß die Proteine in Nachbarschaft zueinander liegen.

Die Markierung von S21 und S1 verdient insofern gesonderte Beachtung,als sie zum 3'-Ende der 16S rRNS gehören.Shine und Dalgarno(25) schlugen einen Mechanismus für die Termination vor,nach dem Terminationscodone eine besondere Bindungsseite am 3'-Ende der 16S rRNS haben.Die Markierung der beiden Proteine kann in dieser Wechselwirkung mit der 16S RNS begründet sein.

Die Analyse der Ribosomen auf die mit der Bromacetylgruppe reagierten Aminosäuren ergaben,daß sowohl in den eingefrorenen als auch in den nicht eingefrorenen Proben fast ausschließlich Cystein markiert worden war.Da die Sequenzen der markierten Proteine bekannt sind und S4,S18,S21 jeweils nur ein Cystein enthalten, kann gefolgert werden,daß bei Protein S4 das Cystein in Stellung 31,bei S18 das Cystein in Position 10 (?) und bei S21 das Cystein in Position 22 markiert wurden.

Es sollte abschließend noch darauf hingewiesen werden, daß Markierungsversuche mit dem chemisch reaktiven Terminationstriplet vom Autor bereits zu Beginn dieser Arbeit veröffentlicht wurden(26,27).Hierbei wurden die gleichen Proteine markiert,es zeigte sich aber, daß das Triplet eine wesentlich geringere Reaktivität besaß als in vorliegender Arbeit.Verglichen mit den damals zugänglichen Daten für die Affinität von *AUG an das Bindungszentrum des Ribosoms ergab sich ein Affinitätsverhältnis *AUG/*UGA = 10/1.
Auf Grund dieses Ergebnisses wurde vermutet,das Ribosom könne von sich aus zwischen Stop- und Elongationscodonen unterscheiden und im Falle des Terminationscodons eine Ablesung unterdrücken.
Die neuen Messungen mit dem chemisch wesentlich besser charakterisierten *UGA zeigen jedoch eindeutig,daß diese Vermutung nicht aufrechterhalten werden kann.

Aus der Tatsache,daß sowohl in der älteren als auch in der neueren Arbeit die gleichen Proteine markiert wurden,gewinnt ein Experiment an Bedeutung,das zur Identifizierung der Bindungsseite des reagierten Triplets in der älteren Arbeit durchgeführt wurde.
Es konnte gezeigt werden,daß Quervernetzung von *UGA an das Ribosom dieses für die EFT-abhängige Bindung von Trp-tRNS$^{trp}_{suIII}$ programmiert.Wie die Bindung von Initiator-tRNS in die Puromycin-resistente Seite von *AUG programmiert wurde,konnte mit diesem Experiment gezeigt werden,daß *UGA im Bereich der 'A'-Seite quervernetzt.Die markierten Proteine S4 und S18 sind demnach ebenfalls dem Bereich dieser Seite zuzuordnen.

In dieser Arbeit gelang es die Codonbindungsstelle des Ribosoms zu charakterisieren und die zugehörigen Proteine zu identifizieren.Die Ergebnisse stimmen gut mit dem Ribosomenmodell,wonach es zwei Bindungsstellen für m-RNS gibt,überein.

5. Zusammenfassung

Es wird die Synthese eines chemisch modifizierten Terminationstriplet beschrieben. Es diente als m-RNS Analoges zur Affinitätsmarkierung an Escherichia-Coli-Ribosomen. Die Synthese setzt sich aus einem chemischen und einem enzymatischen Teil zusammen. Ein stark modifizierter Phosphodiester, die 5'-(4-Nitrophenyl)uridylsäure, konnte als Substrat für die Polynukleotidphosphorylase-katalysierte Kettenverlängerung verwendet werden. Mittels geeigneter chemischer Methoden wurde das 4-Nitrophenylderivat zum Bromacetylaminophenyl-Produkt umgesetzt.
Das modifizierte Terminationscodon wurde mit Ribosmen zur Reaktion gebracht und das Bindungszentrum des Ribosoms markiert. Es konnten je nach Inkubationsbedingungen unterschiedliche Proteine markiert werden. Protein S18 wurde markiert, wenn der Inkubationsansatz zwei Stunden bei 37°C inkubiert war, wurde die Probe dagegen anschließend eingefroren und nochmals für 30 min. inkubiert, so wurde zusätzlich das Protein S4 markiert.
Es wurde die Existenz von zwei Bindungsstellen für m-RNS-Codone auf Grund der eigenen Versuchsergebnisse angenommen und an Hand von Literaturergebnissen diskutiert.
Die markierten Proteine konnten der ribosomalen 'A'-Seite zugeordnet werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Cuatrecasas P.,Wilchek M.,& Anfinsen B.C. (1969) J.Biol.Chem. 244,4316-4329
2. Cantor C.R.,Pellegrini M. & Oen H. (1974) Ribosoms (Nomura M.,Tissières A. & Lengyel P.,eds.) pp 573-585 Cold Spring Harb.Lab.
3. Yaguchi M.,Lanka E.,Dworniczak B.,Kiltz H.H.& Pongs O. Eur.J.Biochem. 92,243-251 (1978)
4. Torriani A.(1968) Methods in Enzymology 12,212-218 (Moldave K. & Grossman L.,eds) Academic Press,New York
5. Schetters H.,Gassen H.G. & Mattaei H. (1972) Biochim.Biophys.Acta 272,549-559
6. Fields R.,Dixon H. & Law G.R. (1971) 121,591-596 Biochem.J.
7. Stahli C.,Noll H. (1977) Molek.gen.Genet. 153,159-168
8. Pongs O.,Stöffler G. & Lanka E. (1975) J.Mol.Biol. 99, 301-315
9. Hardy S.J.S.,Kurland C.G.,Voynow P.,Mora G. (1969) Biochem.Vol 8 No.7 2897
10. Laemmli U.K. (1970) Nature Vol.227 680-685
11. Knopf,Traut Molekular Biology Reports2 (1975)35-40
12. Bonner W.M.,Laskey R.A. (1974) Eur.J.Biochem. 46, 83-88
13. Razzell W.E. & Khorana H.G. (1959) J.Biol.Chem. 234,2105-2113
14. Moffatt J.G. & Khorana H.G. (1957) J.Am.Chem.Soc. 79,3741-3746
15. Glinski R.P.,Ash A.B.,Stevens C.L.,Sporn M.B. & Lazarus H,M. (1971) J.Org.Chem. 36,245-249
16. Thach R.E. (1966) Procedures in Nukleic Acid Research (Cantoni G.L. & Davis D.R.,eds.)pp.520-534 Harper and Row,Publishers
17. Gillam S,Jahnke P.,Smith M.(1978) j.Biol.Chem.Vol.253 No.8 2532-2539

18. Kaufmann G., Frikin M., Zutra A. & Littauer U. (1971)
Eur.J.Biochem. 24, 4-11
19. Noll H., Noll M., Kapke B. & Dieijen G. (1973)
Regulation of Transcription and Translation in
Eukaryotes. 24. Colloquium der Gesellschaft für
Biologische Chemie in Mosbach (Bautz E.K.F., Karlson
P. & Kersten H., eds.) pp. 257-311
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
20. Stöffler G. & Wittmann H.G. (1971)
Proc.Nat.Acad.Sci.USA Vol.68, No.9, pp 2283-2287
21. Lanka E., Dissertation
22. Pongs O. & Lanka E. (1975)
Proc.Nat.Acad.Sci.USA Vol.72, No.4, pp 1505-1509
23. Lührmann R., Eckhardt H. & Stöffler G. (1979)
Nature Vol.280 pp 423-425
24. Wurmbach P. & Nierhaus K.H. (1979)
Proc.Natl,Acad.Sci. USA Vol 5 pp. 2143--2147
25. Stöffler G. & Wittmann H.G. (1977)
Molekular Mechanisms of Protein Biosynthesis
(Weissbach H., Pestka S., eds)
pp 117-202 Academic Press New York San Francisco London
26. Shine F.A. & Dalgarno L. (1974)
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 71, 1342-1346
27. Pongs O. & Rößner E. (1975)
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 356, 1297-1304
28. Pongs O. & Rößner E. (1976)
NAR Vol.3 No.7 pp 1625-1633

Lebenslauf:

Okt.1945 geboren als Sohn des Revisors Ernst Rössner(gef. 1945)und seiner Ehefrau Centa(geb.Dietl) in Nesselwang
Okt.1951-Juli1955 Besuch der Grundschule Nesselwang
Okt.1955-Dez.1959 Besuch der Oberrealschule Füssen
Dez.1959 Wiederverheiratung meiner Mutter;Umzug nach Wiesbaden
1959-1966 Besuch des Realgymnasiums Wiesbaden
1966-1969 Studium der Chemie an der Johannes Gutenberg Universität Mainz;Diplom-Vorexamen
SS 1969-SS1971 Studium der Chemie an der Albert Ludwigs Universität Freiburg i.Br.;Diplom-Hauptexamen
SS 1972 Abschluß der Diplom-Arbeit am Makromolekularen Institut in Freiburg
-April 1973 Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Makromolekularen Institut
Mai 1973 Aufnahme einer Promotionsarbeit am Max Planck
-Sept.1975 Institut für Molekulare Genetik in Berlin unter Anleitung von Dr.C.Pongs
1976-78 verschiedene Tätigkeiten als Chemiker und Lehrbeauftragter
1979-81 Fertigstellung der Promotionsarbeit am Lehrstuhl für Biochemie der Ruhruniversität Bochum unter Prof.Dr.C.Pongs

D. GRÄBNER
DISSERTATIONS U. OFFSETDRUCKEREI

Gotenstraße 3
8602 Altendorf bei Bamberg
Telefon: 09545/8791